Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.2, Summer 2020, P. 273-284
ISSN: 2008 - 4730

نشریه **علوم باغبانی** (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۲۸۴-۲۷۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی توانایی سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes* در القای ریشه مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

مریم زارع حسن آبادی[۱]- علی گنجعلی[۲]*- مهرداد لاهوتی[۳]- نسرین مشتاقی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۷

چکیده

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنلی و ترکیبات فعال زیستی با نقش آنتی‌اکسیدانی است. سیستم کشت ریشه مویین، روشی مناسب برای تولید ترکیبات ثانویه دارویی می‌باشد. جهت بررسی توانایی سویه‌های باکتری *Agrobacterium rhizogenes* در القای ریشه مویین و تولید متابولیت‌های ثانویه، گیاهچه‌های ریحان در محیط کشت $MS_{1/2}$[1] کشت شدند. پس از ۴۵ روز، ریزنمونه‌های برگ، ساقه و نواحی گره توسط چهار سویه باکتری (ATCC-15834, A4, MSU, R1000) تلقیح شدند و ریشه مویین را در زمان‌های متفاوت القاء کردند. پس از ۱۴ روز، ریشه‌های مویین تنها در نواحی گره ظاهر شدند ولی ریزنمونه‌های برگ و ساقه پاسخی به تلقیح نشان ندادند. ریشه‌های تولید شده به محیط MS مایع منتقل شدند و پس از ۶۰ روز، ویژگی‌های رشد و میزان فنل کل بررسی گردید. DNA ژنومی از ریشه‌های مویین و غیرمویین استخراج و ماهیت القای ریشه‌های مویین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol* C در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تایید شد. درصد القای ریشه مویین به طور معنی‌داری تحت تاثیر سویه باکتری قرار داشت. بالاترین درصد القای ریشه (۶۸/۱ درصد)، بیشترین تعداد ریشه مویین در هر ریزنمونه (۴/۸ عدد) و بیشترین طول ریشه (۱/۸ سانتی‌متر) به سویه ATCC-15834 تعلق داشت. بالاترین وزن خشک (۱۰۳/۲ میلی‌گرم) و میزان فنل کل (۳۱۲ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک) به همین سویه مربوط بود که افزایش ۴/۶ برابری نسبت به شاهد غیرمویین داشت. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه ATCC-15834 را می‌توان به عنوان یک سویه موثر در القا و رشد ریشه‌های مویین و نیز تولید متابولیت ثانویه در ریحان معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، ریحان، ریشه مویین، فنل کل

مقدمه

ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* L. گیاهی یک‌ساله و متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد که در انواع شرایط اکولوژیکی و نواحی گرم هند، آفریقا و جنوب آسیا کاشت می‌شود (۳۳). این گیاه دارای کاربردهای اقتصادی مهم و متعددی در زمینه پزشکی و صنایع دارویی، غذایی و آرایشی است. ریحان یک گیاه غنی از متابولیت‌های ثانویه به ویژه پلی‌فنل ها و روغن‌های فرار می‌باشد وبه طور سنتی به عنوان طعم دهنده، در درمان سردرد، سرفه، اسهال، یبوست، بیماری‌های انگلی، ناراحتی‌های کلیوی و درمان آکنه استفاده می شود، خاصیت دفع حشرات و فعالیت ضدانگلی، ضدباکتریایی، ضدقارچ و ضدویروس دارد (۳).

ترکیبات اصلی عطر ریحان شامل استراگول، لینالول، اوژنول، ۱ و۸ - سینئول و متیل سینامات و ترکیبات غیرفرار شامل اسیدهای فنلی کافئیک‌اسید و رزمارینیک‌اسید است. ترکیبات فنلی که به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی و انواع فعالیت‌های زیستی در سلامت انسان اهمیت دارند، فراوان‌ترین نوع متابولیت‌های ثانویه در ریحان می‌باشند (۲۶). مطالعات متعددی در زمینه تولید، خالص‌سازی و افزایش سطح این ترکیبات در گیاهان انجام شده است. استخراج این ترکیبات دارویی از بافت‌های گیاهی به دلیل اثرات شرایط اکولوژیکی بر رشد و بازده آن‌ها، با محدودیت روبرو است (۲۱). رزمارینیک‌اسید (یکی از پلی‌فنل‌های اصلی ریحان) به عنوان یک عامل ضدالتهاب و محافظ اعصاب و عروق شناخته شده است (۳۹).

در حال حاضر از تکنیک‌های مختلفی جهت تولید ترکیبات ثانویه گیاهی در سیستم *in vitro* استفاده می‌شود که ریشه موئین (القای ریشه با واسطه‌ی باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز)، معمول‌ترین و

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشیار و استاد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: ganjeali@um.ac.ir)
۴- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

DOI: 10.22067/jhorts4.v34i2.82167

موثرترین روش برای ایجاد تغییر ژنتیکی در گیاهان و یکی از مهمترین تکنیک‌های کاربردی در این زمینه می‌باشد. کشت ریشه موئین، یک سیستم بالقوه برای تولید ترکیبات ثانویه گیاهی به ویژه ترکیبات دارویی است که به دلیل ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی، سرعت رشد سریع، سهولت نگهداری، رشد ریشه‌ها در محیط فاقد هورمون و تولید بیشتر ترکیبات ثانویه نسبت به گیاهان سالم، مورد توجه قرار گرفته است (۷، ۱۱ و ۲۳). در صورت تولید یک متابولیت خاص در بخش هوایی گیاه، می توان از کشت ریشه مویین برای سنتز آن نیز استفاده کرد (۷). امروزه تولید ترکیبات ثانویه مختلف در گیاهان دارویی ارزشمند در مقیاس بالا، از طریق بیوراکتورهای ریشه مویین امکان‌پذیر شده است (۴۲).

Agrobacterium rhizogenes یک باکتری خاک‌زی گرم منفی (متعلق به خانواده Rhizobiaceae) و مسئول تشکیل ریشه در محل آلودگی می‌باشد. این باکتری می‌تواند T-DNA (که آنزیم‌هایی برای کنترل هورمون اکسین و بیوسنتز سیتوکینین کد می‌کند) را از پلاسمید Ri خود به درون ژنوم میزبان وارد کند. ژن‌های rol موجود در پلاسمید Ri باکتری، ریشه موئین را پس از ورود به ژنوم میزبان القا می‌کنند. این ژن‌ها بر رشد و نمو ریشه‌های موئین تاثیر می‌گذارند و با فعال‌سازی رونویسی از ژن‌های دفاعی، سبب سنتز ترکیبات ثانویه می‌شوند (۲۳).

عوامل متعددی مانند نوع ریزنمونه، ژنوتیپ گیاه، شرایط محیط کشت، سویه باکتری و واکنش متقابل میزبان- باکتری، بر فرایند تراریختی موفق تاثیر می‌گذارند (۱۶). مطالعات قبلی نشان داده است که ریشه‌های موئین القا شده توسط سویه‌های مختلف باکتری، از نظر رشد، مورفولوژی و تولید ترکیبات ثانویه تفاوت دارند (۱۴). بنابراین با توجه به گونه گیاهی باید سویه مناسب آگروباکتریوم انتخاب شود. در کشت ریشه موئین معمولا از سویه‌های تیپ آگروپین[1] به دلیل توانایی بیشتر در بیماری‌زایی استفاده می‌شود (۲۳).

از جمله تحقیقات انجام شده در زمینه ریشه موئین می توان به تولید دیوزژنین در کشت ریشه موئین گیاه بهمن‌پیچ (*Hyocyamus isora* L.) توسط کومار و همکاران (۲۰) ، تولید آلیزارین در کشت ریشه مویین روناس (*Rubia akane*) توسط پارک و همکاران (۳۰) و تولید رزمارینیک‌اسید در کشت ریشه مویین ریحان (۳) اشاره کرد. مجومدار و همکاران (۲۴) نیز تولید پنج برابری ساپونین را در ریشه‌های مویین گیاه نازباتلاقی (*Bacopa monnieri*) نسبت به گیاهان غیرموئین گزارش کردند.احمدی مقدم و همکاران (۱) تولید دوپامین در کشت ریشه موئین خرفه (*Portulaca oleracea*) را نشان دادند. خضرلو و همکاران (۱۹) تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه مویین بذرالبنج مشبک (*Hyocyamus reticulates*)، و رهنما (۳۲) تولید ترکیب سیلیمارین در ریشه مویین گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) را گزارش دادند.

در ایران تحقیقات اندکی روی تولید ریشه مویین در گیاه ریحان صورت گرفته است و با توجه به اهمیت این گیاه به دلیل دارابودن ترکیبات ثانویه ارزشمند، تولید بهینه ریشه‌های مویین از نظر کمی و کیفی ضروری به نظر می رسد. تاکنون مطالعه‌ای در مورد تاثیر سویه های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز در القای ریشه مویین و محتوای ترکیبات فنلی در گیاه ریحان انجام نشده است. لذا این پژوهش با هدف بررسی تاثیر سویه‌های مختلف این باکتری بر القاء و رشد ریشه های مویین و نیز بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه ریحان انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

این مطالعه در دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. بذرهای ریحان (*Ocimum basilicum* L.)(به شماره کد ۴۵۴۹۹ مربوط به ناحیه گچساران) از موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی کرج تهیه شد. بذرها در اتانل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس در هیپوکلریت‌سدیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از هر مرحله، سه بار شستشو با آب مقطر استریل صورت گرفت. بذور استریل در محیط کشت MS (۲۹) حاوی ۰/۷ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز (pH=5.8) کشت داده شدند و به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۳۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. بعد از گذشت ۴۵ روز، گیاهچه‌های حاصل برای تهیه ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی باکتری

در این مطالعه، چهار سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (ATCC-15834, A4, MSU, R1000) از نظر پتانسیل القای ریشه‌های مویین مورد بررسی قرار گرفتند. استوک گلیسرولی این سویه‌های باکتری از پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد تهیه شد. باکتری‌ها در محیط کشت تازه YMB[2] حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ریفامپسین کشت شدند و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر انکوباتور (دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه) در تاریکی قرار گرفتند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از باکتری‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب داده شدند. بر روی رسوب، آب مقطر استریل و ۵۰ میلی‌لیتر استوسرینگون افزوده شد و به مدت دو ساعت روی شیکر قرار گرفت.

1- Agropine-type strains

2- Yeast Manitol Broth

تراکم سلولی باکتری در OD_{600} بین ۰/۶-۰/۷ تعیین گردید و جهت تلقیح به ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

القای ریشه مویین

برای القای ریشه مویین در ریزنمونه‌ها از روش تلقیح مستقیم باکتری‌ها استفاده شد. به این منظور، گیاهچه‌های استریل و نیز جداکشت‌های برگ و قطعات ساقه روی کاغذ صافی در پلیت استریل قرار گرفتند. جهت تلقیح، با استفاده از سرنگ دو میلی‌لیتری از سوسپانسیون باکتری برداشت شد و نمونه باکتری به صورت نقاطی در نواحی رگبرگ اصلی پشت برگ گیاهچه‌ها و جداکشت‌های برگ و ساقه تلقیح شدند. سپس ریزنمونه‌های تلقیح شده، به محیط کشت ۱/۲MS جامد فاقد آنتی‌بیوتیک منتقل و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تلقیح نمونه شاهد نیز از آب مقطر استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، ریزنمونه‌های تلقیح شده جهت حذف باکتری به محیط کشت MS جامد حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر منتقل و در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شدند. ریزنمونه‌ها هر هفت روز یک بار در محیط کشت MS تازه با همین غلظت آنتی بیوتیک واکشت شدند (۴۶).

استقرارکشت ریشه‌های مویین

۳ تا ۱۴ روز پس از کشت با باکتری، ریشه‌های مویین در ناحیه گره‌های گیاهچه‌های استریل ظاهر شدند و پس از شش هفته، نوک ریشه‌ها قطع شدند. ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت ۱/۲MS مایع (pH=5.5) (حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم) در ارلن‌های ۲۰۰ میلی لیتری ریخته شد و ۳۰۰ میلی‌گرم بافت ریشه به ارلن‌ها منتقل گردید. ارلن‌ها به مدت دو ماه بر روی شیکرانکوباتور (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۹۰ دور در دقیقه) در تاریکی نگهداری شدند. ریشه‌ها پس از قرارگیری در محیط مایع رشد سریعی نشان دادند و لذا پس از ۶۰ روز جمع‌آوری شدند و صفات رشد شامل تعداد ریشه‌ها، وزن تر و خشک، درصد القای ریشه مویین و محتوای فنل کل در واحدهای آزمایشی مختلف تعیین شد. برای بدست آوردن درصد القای ریشه مویین از فرمول زیر استفاده شد (۴۴):

درصد القای ریشه مویین = تعداد ریزنمونه های تولید کننده ریشه مویین/تعداد کل ریزنمونه های تلقیح شده × 100

تایید مویینه بودن ریشه‌ها با واکنش PCR

DNA ژنومی از ریشه‌های مویین و غیرموئین ریحان (از گیاهچه‌های بدون تلقیح) براساس روش CTAB (۳۶) استخراج و در آنالیز PCR برای تشخیص ژن *rol*C و *vir*D2 استفاده شد. روش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C و *vir*D2 باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز انجام شد. پلاسمید Ri سویه‌های مختلف آگروباکتریوم به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C به صورت زیر بود:

Forward-5`CTCCTGACATCAAACTCGTC-3`
Reverse-5` TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3`

ابتدا مخلوط PCR (۲۰ میکرولیتر) حاوی حدودا ۵۰ نانوگرم DNA الگو تهیه گردید. جهت تکثیر DNA استخراج شده از هر نمونه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C، از برنامه دمایی زیر در دستگاه ترموسایکلر (مدل Analytikjena, Gradient) استفاده شد: واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه و مدت ۴ دقیقه)، واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۳۵ چرخه به مدت ۶۰ ثانیه)،اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۳۰ ثانیه)، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۶۰ ثانیه)،و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۷ دقیقه). برای مشاهده محصولات PCR، از ژل آگارز یک و نیم درصد استفاده شد. ژل حاصل داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر ۱۰TBE درصد (تریس بوریک اسید- EDTA) قرار گرفت. ۰/۸ میکرولیتر از رنگ Gold (ساخت شرکت پارس توس) و ۵ میکرولیتر از محصول PCR با یکدیگر مخلوط و در هر چاهک ژل ریخته شد. الکتروفورز تحت ولتاژ ۸۰ ولت و جریان ۲۵ آمپر انجام و ژل با استفاده از نور UV در دستگاه ژل داک (BioDoc-It 220, UK) بررسی شد.

سنجش فنل کل

برای استخراج عصاره طبق روش اسریواستاوا و همکاران (۳۸)، ۲۵ میلی گرم از ریشه خشک شده، با ۲۵ میلی‌لیتر متانل ۶۰ درصد به روش فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه عصاره‌گیری شدند و عصاره‌ها پس از عبور از کاغذ صافی برای سنجش مورد استفاده قرار گرفتند. طبق روش سینگلتون و روسی (۳۷) برای سنجش فنل کل، یک میلی‌لیتر عصاره متانلی، ۴ میلی‌لیتر آب‌مقطر، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو و ۱/۲۵ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۲/۱ درصد با هم مخلوط و برای ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. سپس جذب مخلوط در ۷۳۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدلShimadzu, Japan) اندازه-گیری شد. برای شاهد از همان مخلوط ولی بدون نمونه استفاده شد. منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید رسم شد و غلظت-های فنل کل نمونه‌ها به صورت میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک (mg GAE/g DW) بیان شدند.

آنالیز آماری

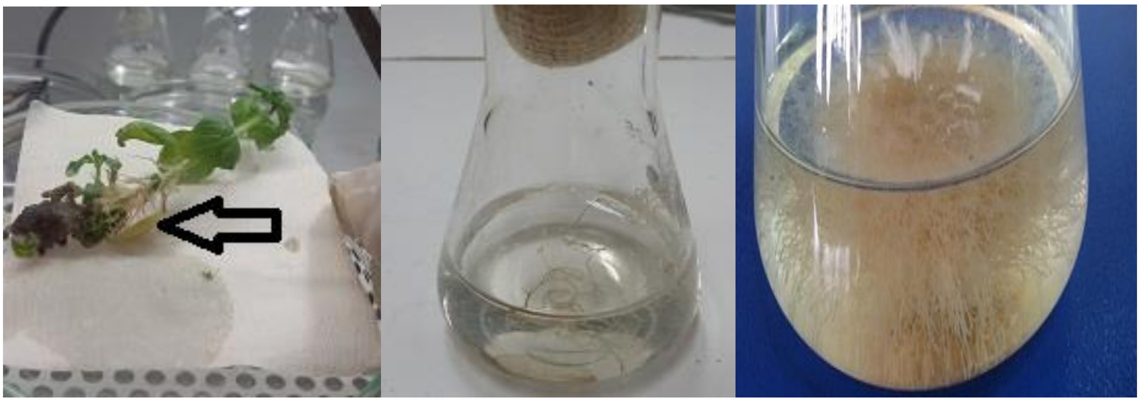
آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. داده-های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) قرار گرفتند. میانگین‌ها به کمک آزمون چند

دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد مقایسه شدند و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

تاثیر سویه باکتری و نوع ریزنمونه در القای ریشه مویین

در این بخش، تاثیر چهار سویه آگروباکتریوم رایزوژنز (ATCC-15834, A4, MSU, R1000) بر القاء و رشد ریشه مویین در ریزنمونه‌های ساقه، برگ و گره‌های گیاه ریحان مورد بررسی قرار گرفت. هر چهار سویه قادر به القای ریشه مویین در زمان‌های مختلف بودند. در ریزنمونه‌های ساقه و برگ تلقیح شده توسط هر یک از چهار سویه باکتری، ریشه مویین تشکیل نشد و این ریزنمونه‌ها پس از مدتی نکروزه و از بین رفتند،ولی در بافت گره گیاهچه‌های استریل (جایگاه‌های تلقیح)، ریشه‌ها تشکیل شدند (شکل ۱). ریشه‌های القا شده توسط هر یک از چهار سویه باکتری، انشعابات زیاد و رشد سریع داشتند و تفاوت مورفولوژیکی اندکی بین آن‌ها مشاهده شد. در ریزنمونه‌های غیرموئین (شاهد) که تلقیح باکتریایی نشده بود، ریشه مویین تشکیل نگردید که این امر نشان می‌دهد نمو ریشه‌های مویین به دلیل پاسخ مورفوژنتیک، و نه تنش فیزیولوژیکی، می‌باشد.



(c)(ج) (b) (ب) (a) (الف)

شکل ۱- الف: تشکیل ریشه مویین در گیاهچه ریحان (*Ocimum basilicum*) در محل گره‌ها (جایگاه‌های تلقیح) ، ۵ روز پس از تلقیح باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (سویه ATCC-15834)، ب: کلون‌های ریشه مویین دو هفته پس از تلقیح، ج : رشد ریشه‌های مویین در محیط کشت دو ماه پس از تلقیح

Figure 1- A: Hairy root formation in nodes of *Ocimum basilicum* explant after 5 days of inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC-15834. B: Hairy roots after 2 weeks of co-cultivation in ½ MS medium, C: Hairy roots after 2 month of co-cultivation in ½ MS medium

انتخاب ریزنمونه مناسب در فرایند القای ریشه مویین بسیار حائز اهمیت است. در میان ریز نمونه‌های مورد بررسی، ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ و ساقه تشکیل نشد که علت آن احتمالاً حساس بودن این بافت‌ها و قهوه‌ای و نکروزه شدن آن‌ها در محیط کشت بود. ریشه‌های مویین تنها در ناحیه گره‌ها ظاهر شدند که علت آن می‌تواند حساسیت پذیری (با توجه به وضعیت فیزیولوژیکی بافت) و مستعد بودن این ناحیه به تراریختی باشد (۱۸). این نتایج با مطالعه گاندی و گیری (۱۲) مطابقت دارد. آن‌ها با بررسی القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ، گره و ساقه‌ی گیاه آب بشقابی (*Centella asiatica*) مشاهده کردند که ریشه‌ها تنها در نواحی گره ظاهر شدند و سایر ریزنمونه‌ها پاسخی به القای ریشه نشان ندادند.

فارسی و همکاران (۱۰) ریزنمونه گره ساقه را به عنوان بهترین ریزنمونه برای تولید ریشه مویین در تاتوره (*Datura stramonium*) گزارش دادند در صورتی که دانیال و همکاران (۸)، هیپوکوتیل را بهترین ریزنمونه برای القای ریشه مویین در *Eurycoma longifolia*، و موهیودین و همکاران (۲۸)،دم برگ را ریزنمونه مناسب برای تشکیل ریشه مویین در خربزه (*Cucumis melo*) معرفی کردند. البته در بعضی گزارش‌ها، سویه R1000 به عنوان موثرترین سویه در القای ریشه موئین معرفی شده است (۴۵). بنابراین توانایی سویه‌های مختلف در القا ریشه مویین با توجه به گونه گیاه متفاوت است.

پاسخ متفاوت بافت های گیاهی به القای ریشه مویین با آگروباکتریوم رایزوژنز در مطالعات پیشین گزارش شده است و اثرات معنی‌دار سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر القای ریشه مویین اثبات شده است (۹ و ۴۱). درواقع جوان بودن بافت، توازن هورمونی و ماهیت ریزنمونه، عوامل مهمی در القا و تولید ریشه مویین می‌باشند (۲۷). پاسخ به زخم، مهمترین فاکتور در تراریختی موفق است و ریزنمونه‌هایی که پاسخ شدیدی به زخم می‌دهند، توده‌های سلولی

جهت ترمیم زخم تشکیل می‌دهند. اختلاف سلول‌های ریزنمونه از نظر سنتز DNA و توانایی تقسیم سلولی، به مرحله بلوغ فیزیولوژیکی آن‌ها ارتباط دارد (۴۲).

در بررسی تاثیر سویه باکتری بر تراریختی، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که درصد القای ریشه مویین به طور معنی‌داری تحت تاثیر سویه‌های مختلف باکتری قرار گرفت. در این آزمایش، تفاوت معنی‌داری بین سویه ATCC-15834 و سایر سویه‌ها از نظر درصد القای ریشه مویین وجود داشت ($P\leq0.05$). در بین چهار سویه ی باکتری مورد مطالعه، سویه ATCC-15834 با ۶۸/۱ درصد القای ریشه مویین پس از ۵ روز از تلقیح، قوی‌تر از سایر سویه ها عمل کرد و پس از آن سویه های A4 با ۵۸/۲ درصد، MSU با ۵۱/۵ درصد و R1000 با ۱۱/۳ درصد قرار گرفتند (جدول ۱).تاثیر دو سویه A4 و MSU در ریشه‌زایی، کمتر از سویه ATCC-15834 و بیشتر از R1000 بود.سویه R1000 کمترین بازده را داشت و تنها در ۱۱/۳ درصد گره‌های تلقیح شده، ریشه مویین تشکیل گردید. به طور کلی مشخص شد که سویه ATCC-15834 و گره‌ها، بهترین پاسخ را به تشکیل ریشه مویین در ریحان می‌دهند.در مطالعات پیشین، تاثیر سویه باکتری بر درصد القای ریشه مویین در گونه‌های گیاهی مختلف اثبات شده است (۴۷).

جدول ۱- تاثیر سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز بر رشد ریشه مویین ریحان *O.basilicum* (۶۰ روز پس از تلقیح) . نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده است.

Table 1- Effect of different strains of *A. rhizogenes* on hairy root growth of *O.basilicum* (after 60 days of co-cultivation). Values represent the mean ± SD.

سویه‌های *آگروباکتریوم* *A.rhizogenes* strains	طول ریشه مویین Hairy root length (cm)	تعداد ریشه‌مویین در هر ریزنمونه Number of hairy roots per explant	القای ریشه مویین (درصد) Infection frequency	روز مورد نیاز برای القا ریشه مویین (سرعت ریشه‌زایی) Days for hairy root induction
ATCC-15834	1.8±0.1[a]	4.8±0.2[a]	68.1±4.3[a]	3-5
MSU	1.3±0.2[b]	3.1±0.5[b]	51.5± 3.9[b]	7
A4	1.1±0.1[b]	2.8±0.3[b]	58.2±5.1[b]	9-10
R1000	0.5±0.3[c]	1.2±0.2[c]	11.3±5.6[c]	14

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نمی‌باشند.

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($p\leq0.05$) based on Duncan’s multiple range test.

یکی از فاکتورهای مهم در دستیابی به ریشه مویین، انتخاب سویه مناسب باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز با توجه به نوع گیاه است (۳۴ و ۳۵). این باکتری طیف میزبانی وسیعی دارد و می‌تواند ریشه مویین را در گیاهان مختلف القا کند (۲۰). سویه ATCC-15834 به طور وسیعی برای القای ریشه مویین در گیاهان مختلف استفاده شده است و نتایج مشابهی در رابطه با کارایی بهتر این سویه نسبت به سایر سویه‌های مورد بررسی در گیاهان مختلف مانند گیاه بهمن‌پیچ (*Plumbago indica*) (۲۰)، گیاه علف‌سربی (*Helicteris isora*) (۱۳) ، هزار چشم (*Hypericum perforatum*) (۴) و شویدی (*Cosmos bipinnatus*) (۱۶) تایید شده است.

نتایج بدست آمده نشان داد که توانایی القای ریشه مویین توسط سویه‌های مختلف این باکتری در گیاه ریحان متفاوت است. انتقال T-DNA تحت تاثیر عوامل متعددی قرار دارد، از جمله سویه باکتری، تراکم سوسپانسیون باکتری، دوره تلقیح، ژنوتیپ میزبان، نوع ریزنمونه، وضعیت هورمونی بافت و شرایط محیط کشت (۲۷). ورود پلاسمیدهای مختلف در سویه‌های باکتری، می‌تواند یکی از دلایل اختلاف در سطح بیماری‌زایی آن‌ها باشد (۴۲). همچنین بیان افتراقی ژن‌های T-DNA در ریزنمونه‌ها، تعداد متغیر نسخه‌های وارد شده T-DNA، و اثرات تلفیق T-DNA در جایگاه‌های مختلف ژنوم میزبان می‌توانند عوامل موثر در میزان درصد القا ریزنمونه‌ها باشند (۴۳).

سرعت القا، تعداد و طول ریشه مویین

هر چهار سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز قادر به القای ریشه مویین بودند و در سرعت القای ریشه مویین این سویه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱). بالاترین سرعت القای ریشه مویین به سویه ATCC-15834 تعلق داشت. ریشه های مویین حاصل از تلقیح این سویه، به طور میانگین ۴ روز پس از تلقیح، بر گیاهچه‌ها ظاهر شدند. کم‌ترین سرعت تشکیل ریشه‌های مویین، در گیاهچه های تلقیح شده با سویه R1000 مشاهده شد که حدود ۱۴ روز طول کشید، در صورتی که القای ریشه‌های مویین توسط سویه‌های A4 و MSU به ترتیب به ۷ و ۱۰ روز زمان نیاز داشت. به طور کلی زمان

ظهور ریشه‌های مویین تحت تاثیر سویه باکتری قرار داشت و این زمان بین ۳ تا ۱۴ روز متغیر بود.

بیشترین تعداد ریشه‌های مویین در هر گیاهچه (۴/۸ ریشه) و بیشترین طول ریشه (۱/۸ سانتی‌متر) متعلق به سویه ATCC-15834 بود که نسبت به سه سویه دیگر معنی‌دار بود ($P\leq0.05$)(جدول ۱). اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های MSU و A4 از نظر تعداد و طول ریشه القا شده وجود نداشت ولی سویه R1000 با توجه به درصد تعداد ریشه القا شده (۱/۲ ریشه) و طول ریشه (۰/۵ سانتی‌متر) ضعیف‌ترین عملکرد را در بین سایر سویه‌ها به خود اختصاص داد و اختلاف معنی‌داری با سایرین داشت.

وزن خشک ریشه‌های مویین

نتایج حاصل از بررسی داده‌ها نشان داد که سویه‌های مختلف باکتری، تاثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه‌های مویین دارند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که پس از ۶۰ روز، بیشترین و کمترین وزن خشک ریشه‌های مویین به ترتیب به سویه ATCC-15834 (۱۰۳/۲ میلی‌گرم در هر ارلن) و سویه R1000 (۹/۳ میلی‌گرم در هر ارلن) مربوط بود تفاوت معنی‌داری در وزن خشک ریشه‌های مویین القا شده با سویه‌های MSU (۵۳/۱ میلی گرم) و A4 (۴۸/۲ میلی‌گرم) مشاهده نشد (شکل ۳). مقدار وزن خشک ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح سویه ATCC-15834 نسبت به شاهد غیرموئین، حدود ۶ برابر افزایش یافت.

اختلاف در مورفولوژی و میزان رشد ریشه‌های موئین را می‌توان به تنوع پلاسمیدهای وارد شده توسط سویه‌های مختلف باکتری نسبت داد که به چگونگی تاثیر ژن‌های *rol* مربوط می‌شود. بیان این ژن‌ها، سطح هورمون‌های اکسین و سیتوکینین گیاه میزبان و نیز میزان حساسیت سلول‌های گیاهی به سطح هورمون‌های رشد را تغییر می‌دهند (۴۵).

نتایج واکنش PCR

DNAژنومی ریشه‌های طبیعی (غیرمویین) ، ریشه‌های مویین و DNA پلاسمیدی سویه‌های باکتری به روش CTAB استخراج شد. تکنیک PCR با استفاده از ژن‌های *rol* C و *vir* D2 باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز، جهت تایید مولکولی و ورود T-DNA باکتری به ریشه‌های مویین بکار رفت. نمونه باکتری به عنوان کنترل مثبت و ریشه غیرموئین به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (شکل ۲). حضور ژن *rol* C (که بر روی پلاسمید Ri باکتری قرار دارد) برای تایید وجود این قطعه در ژنوم ریشه القا شده بکار رفت. ژن *vir* D2 (که در خارج از T-DNA باکتری قرار دارد) برای تایید عدم وجود باکتری در ریشه‌های مویین مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی، بر روی ژل آگارز ۲ درصد و با استفاده از مارکر DNA یک کیلوبازی به عنوان مرجع، الکتروفورز شدند و سپس ژل در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت. باند مربوط به قطعه ۶۱۲ کیلوبازی ژن *rol*C، در DNA تکثیر شده تمام ریشه‌های مویین مشاهده شد ولی این باند در محصول PCR از DNA ریشه‌های غیرموئین (شاهد) یافت نشد. باند مربوط به ژن *vir* D2 نیز در نمونه‌های ریشه مویین مشاهده نگردید.

این نتایج، ماهیت مویینه بودن تمام ریشه‌های موئین را در سطح مولکولی تایید کردند و تلفیق موفقیت‌آمیز قطعات T-DNA پلاسمید Ri آگروباکتربوم در ژنوم گیاه ریحان، بدون حضور باکتری، تایید شد. در میان ژن‌های *rol*، ژن *rol*B نقش حیاتی در بیماری‌زایی دارد در حالی که ژن‌های *rol*A, *rol*C و *rol*D در القای ریشه‌های مویین نقش دارند (۴۲).

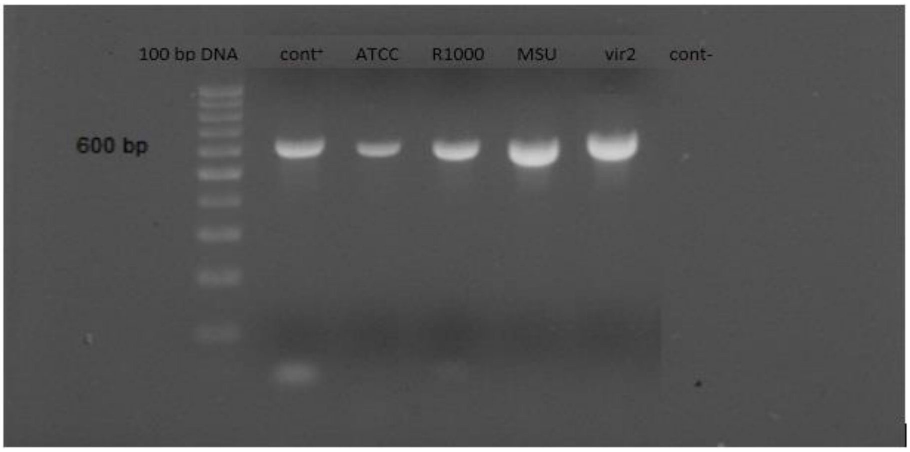
سنجش فنل کل

محتوای فنل کل در ریشه‌های مویین حاصل از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم و ریشه‌های شاهد(غیرموئین) اندازه‌گیری و مقایسه شدند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که محتوای فنل کل در ریشه‌های مویین القا شده توسط سویه‌های مختلف باکتری، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد غیرموئین داشت ($P<0.05$). بالاترین محتوای فنل کل (۳۱۲/۷ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک)در ریشه‌های القا شده با سویه ATCC-15834 مشاهده شد که نسبت به شاهد غیرموئین (۶۷/۹ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک) حدود ۴/۶ برابر افزایش نشان داد.مقدار فنل کل در سویه‌های MSU (۲۱۹ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک) و A4 (۱۹۵ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک) بود که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در مقایسه سویه‌ها، کمترین مقدار ترکیبات فنلی(۱۱۵/۳ میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم وزن خشک) به سویه R1000 تعلق داشت.

مطالعات قبلی، کارایی متفاوت سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز را در تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موئین نشان داده‌اند و تولید این ترکیبات به صورت "سویه اختصاصی"[1] پیشنهاد شده است. یونکوا و همکاران (۱۵) با بررسی ریشه‌های موئین نوعی گون (*Astragalus mongholicus*) گزارش دادند که سویه‌های مختلف این باکتری، تاثیر متفاوتی بر سرعت رشد، تولید ساپونین و نسبت ترکیبات ثانویه مختلف دارند. طبق تحقیقات ماتیوس و همکاران (۲۵)، نوع سویه‌ی آگروباکتریوم رایزوژنز، بر سرعت رشد و تولید تروپان آلکالوئیدها در کشت ریشه مویین بذرالبنج مصری (*Hyocyamus muticus*) تاثیر می گذارد. تیواری و همکاران

1- Specific-strain

(۴۵) با تلقیح چهار سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز به گل‌سپاس (*Gentiana macrophylla*) و القای ریشه‌های مویین نشـان دادنـد که هر لایـن ریشـه مـوئین، بـه صـورت متفـاوتی بـه رشـد و تولیـد گلوکوزیدها پاسخ می‌دهد. بنابراین انتخاب سـویه مـوثر آگروبـاکتریوم برای تولید ریشه‌های موئین، به نوع گونه گیاهی بستگی دارد و باید به دقت صورت گیرد (۲۳).



شکل ۲- آنالیز PCR ریشه‌های مویین *Ocimum basilicum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol* C. به ترتیب از چپ به راست چاهک اول: مارکر مولکولی (100-bp DNA ladder).+cont: DNA پلاسمید باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز (کنترل مثبت). چاهک سوم تا پنجم: DNA ژنومی از ریشه‌های موئین با سویه‌های ATCC-15834،R1000وMSU. -cont: DNA ژنومی از ریشه غیر موئین (کنترل منفی).

Figure 2- PCR analysis of *rol*C gene in hairy roots of *Ocimum basilicum*, Lane 1: Molecular marker (100 bp ladder DNA). Lane 2: *A. rhizogenes* DNA positive control. Lane 3-5: DNA from hairy roots induced with ATCC-15834, R1000, MSU, respectively. Lane 6: DNA from non-transformed root (negative control)

نتایج تحقیق کرم و همکاران (۱۷) بر انباشتگی رزمارینیـک‌اسـید در ریشه‌های مـوئین *Salvia fruticosa* نشـان داد کـه ریشـه‌هـای موئین می‌توانند این ترکیبـات را در مـدت زمـان کوتـاهتری تولیـد و ذخیره کنند. توانایی تولید انواع ترکیبات ثانویه در ریشـه‌هـای مـوئین مریم‌گلی (*Salvia miltiorrhiza*) تلقیح شـده بـا سـویه‌ی ATCC-15834، توسط چن و همکاران (۶) نشان داده شد. طبق گزارش لی و همکـاران (۲۲)، ریزنمونـه‌هـای بـرگ و سـاقه‌ی گیـاه *Agastache rugosa* نیز پس از تلقیح با سویه‌ی R1000 و ایجـاد ریشـه مـوئین، انواع ترکیبات ثانویه را تولید کردند.

تولید ترکیبات فنلی در کشت ریشه‌های مویین بسیاری از گیاهان مانند گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum*) (۲۱) گـزارش شـده است. پارک و همکاران (۳۱) توانستند مقادیر زیادی از ترکیبات فنلـی مانند کافئیک اسید و روتین را در کشت ریشه‌های مویین ۲۱ روزه *F. tataricum* تولیـد کننـد. هـم‌چنین،افـزایش تولیـد گلیسـیریزین و فلاونوئیـدها در کشـت ریشـه مـویین شـیرین‌بیـان (*Glycyrrhiza glabra*) تایید شده است (۲).

طبق نتایج حاصل از این پژوهش، محتـوای فنـل کـل در تمـام ریشه‌های مویین بالاتر از ریشه‌های غیرموئین (شاهد) بود و در ریشـه های موئین القا شـده بـا سـویه ATCC-15834، حـدود ۴/۶ برابـر نسبت به شاهد افزایش یافت.این نتایج با یافته‌های قبلی مطابقت دارد (۷ و ۴۰). گابر و همکاران (۱۱) تا سه برابر محتـوای فنلـی بیشـتر در کشـت ریشـه‌هـای مـویین *F.esculentum* گـزارش دادنـد. بـیس و همکاران (۳) نیز تولید سه برابری رزمارینیـک‌اسـید را در ریشـه‌هـای مویین ریحان نسبت به گیـاه غیرمـوئین نشـان دادنـد. مقـدار بـالاتر ترکیبات فنلی در ریشه‌های مویین می‌تواند ناشـی از اثـرات ژن *rol*B در فراتنظیمی ژن‌های مربوط به تولید ترکیبات ثانویه باشد (۵).

نتایج این مطالعه نشان داد که محتوای ترکیبـات فنلـی در ریشـه های مویین با توجه بـه نـوع سـویه آگروبـاکتریوم، متفـاوت اسـت و ریشه‌های مـوئین القـا شـده بـا سـویه ATCC-15834، از بـالاترین محتوای فنلی برخوردار بودند.

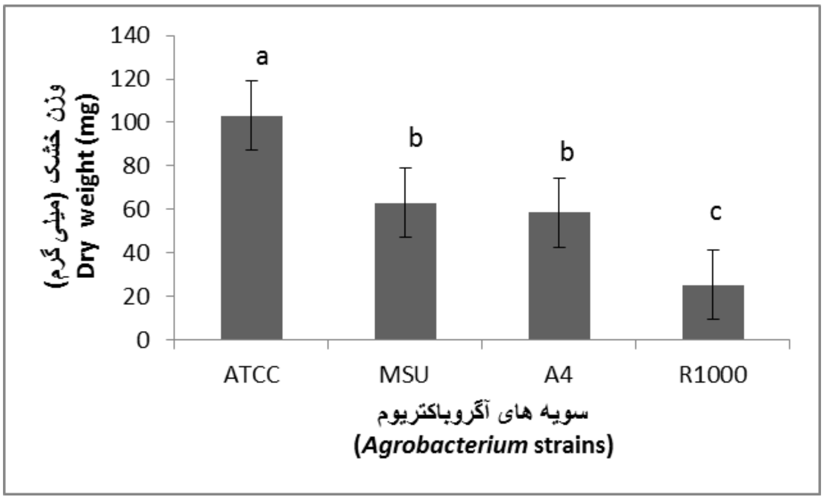
نتیجه‌گیری

در ایـن پـژوهش بـرای اولـین بـار تـاثیر چهـار سـویه بـاکتری آگروباکتریوم رایزوژنـز (ATCC-15834, A4, MSU, R1000) بـر القای ریشه‌های مویین، صـفات رشـد و محتـوای ترکیبـات فنلـی در ریشه‌های موئین ریحان مورد بررسی قـرار گرفـت. در ایـن آزمـایش، بافت گره به عنوان تنها بخش پاسخ‌دهنده به القای ریشه‌های مـویین تایید شد. سویه ATCC-15834 به دلیل تولید وزن خشـک بیشـتر، درصد و سرعت بالاتر در القای ریشه‌های مویین و تولید محتوای فنلی بیشتر، به عنوان بهترین سویه در گیاه ریحان پیشنهاد شد. نتایج ایـن

تحقیق، اطلاعات مناسبی را جهت تولید ریشه‌های مویین و سنتز ترکیبات فنلی ارزشمند، فراهم می‌سازد.

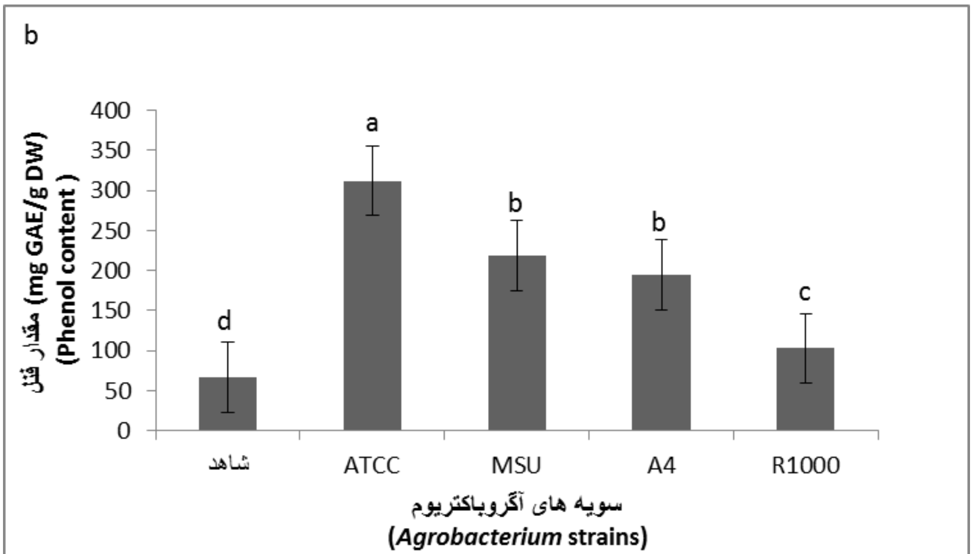
سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح شماره ۳ دانشگاه فردوسی مشهد به شماره ۲۹۵۸۹ انجام گرفته است. از پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد برای تامین استوک باکتری و مرکز زیست‌فناوری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد برای فراهم سازی امکانات جهت انجام آنالیز مولکولی PCR قدردانی می‌شود.



شکل ۳- اثر سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز بر مقدار وزن خشک ریشه مویین ریحان (*Ocimum basilicum*) (۶۰ روز پس از تلقیح)

Figure 3- Effect of different strains of *A. rhizogenes* on dry weight of hairy root of *O.basilicum* (after 60 days of co-cultivation). (DMRT, p≤ *0.05*)



شکل ٤- اثر سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز بر مقدار فنل کل ریشه مویین ریحان (*Ocimum basilicum*) (۶۰ روز پس از تلقیح)

Figure 4- Effect of different strains of *A. rhizogenes* on total phenol content of hairy root of *O.basilicum* (after 60 days of co-cultivation).(DMRT, *p≤ 0.05*)

منابع

1- Ahmadi Moghadam Y., Piri K., Bahramnejad B., and Ghiasvand T. 2014. Dopamine production in hairy root cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) using *Agrobacterium rhizogenes.* Journal of Agricultural Science and Technology 16: 409-420.

2- Asada Y., Li W., Yoshikawa T. 1998. Isoprenylated flavonoids from hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra*. Phytochemistry 47: 389-392.

3- Bais H.P., Walker T.S., Schweizer H.B., and Vivanco J.M. 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Plant Physiology Biochemistry 40:983-95.

4- Bivadi V., Asghari Zakaria R., Zare N., and Yazdani B. 2014. Effects of different tissue culture conditions in hairy roots induction in *Hypericum perforatum L.* International Research Journal of Applied and Basic Sciences 8(5): 597-604.

5- Bulgakov V.P., Vereshchagina Y.V., Bulgakov D.V., Veremeichik G.N., and Shkryl Y.N. 2018. The rolB plant oncogene affects multiple signaling protein modules related to hormone signaling and plant defense. Scientific Reports 28(1): 2285.

6- Chen H., and Chen F. 2000. Induction of phytoalexin formation in crown gall and hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza* by methyl viologen. Biotechnology Letters 22(8): 715–720.

7- Chung I.M., Rekha K., Rajakumar G., and Thiruvengadam, M. 2016. Production of glucosinolates, phenolic compounds and associated gene expression profiles of hairy root cultures in turnip (*Brassica rapa* ssp. rapa). 3 Biotech 6:175.

8- Danial M., Keng C.L., Alwee S.S., and Subramaniam S. 2011. Seed histology of recalcitrant *Eurycoma longifolia* plants during germination and its beneficial attribute for hairy roots production. Journal of Medicinal Plants Research 5(1): 93-98.

9- Danphitsanuparn P., Boonsnongcheep P., Boribonkaset T., Chintapakorn Y., and Prathanturarug S. 2012. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* strains and other parameters on production of isoflavonoids in hairy roots of *Pueraria candollei* Grah. Ex Benth. Var. candollei. Plant Cell Tissue and Organ Culture 111: 315–322.

10- Farsi M., Moshtaghi N., Shahriari F.A., and Raeisi M. 2005. Investigation on growth stability and alkaloid content of transformed hairy roots in *Datura stramonium.* Agricultural Sciences and Technology 19(2): 47-56.

11- Gabr A.M., Sytar O., Ahmed A.R., and Smetanska I. 2012. Production of phenolic acid and antioxidant activity in transformed hairy root cultures of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). Australian Journal of Basic and Applied Sciences 6(7): 577-586.

12- Gandi S., and Giri A. 2012. Genetic transformation of *Centella asiatica* by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Pharmacognosy 3(2): 82-84.

13- Gangopadhyay M., Chakraborty D., Bhattacharyya S., and Bhattacharya S. 2010. Regeneration of transformed plants from hairy roots of *Plumbago Indica.* Plant cell tissue and organ culture 102(1): 109-114.

14- Gupta R., Pandey P., Singh S., Singh D.K., Saxena A., Luqman S., Bawankule D.U., and Banerjee S. 2015. Advances in *Boerhaavia* diffuse a hairy root technology: a valuable pursuit for identifying strain sensitivity and up-scaling factors to refine metabolite yield and bioactivity potentials. Protoplasma 253(4): 1145–1158.

15- Ionkova I., Karting T., and Alfermann W.1997.Cycloartanesaponin production in hairy root cultures of *Astragalus mongholicus*. Phytochemistry 45: 1597-1600.

16- Jaberi M., Sharafi A., Sharafi A.A., Azadi P. Kheiri-Manjili H., Danafar H., and Ahmadnia A. 2018. Genetically Transformed Root-Based Culture Technology in Medicinal Plant *Cosmos bipinnatus.* Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 13(1): e67182.

17- Karam N.S., Jawad F.M., Arikat N.A., and Shibli R.A., 2003. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 73: 117-121.

18- Khalili S., Moieni A., and Abdoli M. 2014. Influence of different strains of Agrobacterium rhizogenes, culture medium, age and type of explant on hairy root induction in *Echinacea angustifolia*. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 3(1): 49-56.

19- Khezerluo M., Hosseini B., and Amiri J. 2018. Sodium nitroprusside stimulated production of tropane alkaloids and antioxidant enzymes activity in hairy root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. Acta Biologica Hungarica 69(4): 437-448.

20- Kumar V., Desai D., and Shriram V. 2014. Hairy root induction in *Helictere sisora* L. and production of Diosgenin in hairy roots. Natural Products and Bioprospecting 4: 107–112.

21- Lee S.Y., Cho S.I., Park M.H., Kim Y.K., Choi J.E., and Park S.U. 2007. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat *(Fagopyrum esculentum* M.). Preparative Biochemistry and Biotechnology 37(3): 239-246.

22- Lee S.Y., Xu H., Kim Y.K., and Park S.U. 2008. Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 969-972.

23- Lee S.U., Kimi S.U., Song W.S., Kim Y.K., Park N.I., and Park S.U. 2010. Influence of different strains of

Agrobacterium rhizogenes on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in *Rubiaakane* Nakai. Romanian Biotechnological Letters 15(4): 5405-5409.

24- Majumdar S., Garai S., and Jha S. 2011. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopasaponins in transformed calli and plants. Plant Cell Reports 30(5): 941-954.

25- Mateus L., Cherkaout S., Christen P., and Oksman-Caldentey K.M. 2000. Simultaneous determination of scopolamine, hyoscyamine and littorine in plants and different hairy root clones of *Hyoscyamus muticus* by micellar electrokinetic chromatography. Phytochemistry 54: 517-523.

26- Modnicki D., and Balcerek M. 2009. Estimation of total polyphenols contents in *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. commercial samples. Herba Polonica 55(1): 35-42.

27- Moehninsi A. and Navarre D.A. 2018. Optimization of Hairy Root Induction in *Solanum tuberosum.* American Journal of Potato Research 95(6): 650-658**.**

28- Mohiuddin A.M., Cabdullah Z., Chowdhury K., Harikrishna K., and Napis S. 2011. Enhanced virulence gene activity of *Agrobacterium* in Muskmelon (*Cucumis melo* L.) cv. `Birdie´. Notulae Scientia Biologicae 3: 71-79.

29- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology 15: 473-497.

30- Park S.U., Kim Y.K., and Lee S.Y. 2009. Establishment of hairy root culture of *Rubiaakane* Nakai for alizarin and purpurin production. Scientific Research and Essay 4(2): 094-097.

31- Park N.I., Xiaohua L., Uddin R.M., and Park S.U. 2011. Phenolic compound production by different morphological phenotypes in hairy root cultures of *Fagopyrum tataricum* Gaertn. Archives of Biological Sciences 63(1): 193-198.

32- Rahnama H. 2007. Silimarin production using hairy root culture of *Silybum marianum*. In: Proceedings of Symposium of Medicinal Plants. Iran, Shahed University, 554-573. (In Persian with English abstract)

33- Scagel C.F., and Lee J. 2012. Phenolic composition of basil plants is differentially altered by plant nutrient status and inoculation with mycorrhizal fungi. Horticultural Science 47:660–671.

34- Sharafi A., Sohi H.H., Mousavi A., Azadi P., Razavi K., and Ntui V.O. 2013. A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 113: 1–9.

35- Sharma M., Ahujab A., Guptac R., and Mallubhotla S. 2014. Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. Natural Product Research 29(8): 745-749.

36- Sharp P.I., Kries M., Shewry P.R., and Gale M.D. 1988. Location of β-amylase sequences in wheat and its relatives. Theoretical and Applied Genetics 75(2): 286-290.

37- Singleton V.L., and Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of enology and viticulture 16:144-158.

38- Srivastava S., Cahill D.M., Conlan X.A., and Adholeya A. 2014. A novel in vitro whole plant system for analysis of polyphenolics and their antioxidant potential in cultivars of *Ocimum basilicum***.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 62(41): 10064–10075.

39- Srivastava S., Conlan X.A., Adholeya A., and Cahill D.M. 2016. Elite hairy roots of *Ocimum basilicum* as a new source of rosmarinic acid and antioxidants. Plant Cell Tissue Organ Culture 126: 19–32.

40- Stojakowska A., Malarz J., Szewczyk A., and Kisiel W. 2012. Caffeic acid derivatives from a hairy root culture of *Lactucavirosa*. Acta Physiologiae Plantarum 34(1): 291-298.

41- Sudha C.G., Sherina T.V., Anand V.P., Reji J.V., Padmesh P., and Sonia E.V. 2012. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the medicinal plant *Decalepis arayalpathra* and production of 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde. Plant Cell Tissue and Organ Culture 112: 217–226.

42- Sujatha G., Zdravkovic-Korac S., Calic D., Flamini G. and Ranjitha Kumari B.D. 2013. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis**.** Industrial Crops and Products 44: 643-652.

43- Tenea G.N., Calin A., Gavrila L., and Cucu N. 2008. Manipulation of root biomass and biosynthetic potential of *Glycyrrhiza glabra* L. plants by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Romanian Biotechnological Letters 13(5): 3922–3932.

44- Thilip C., Raju C.S., Varutharaju K., Aslam A., and Shajahan A. 2015. Improved *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root culture system of *Withania somnifera* L. Dunal using sonication and heat treatment. 3Biotech 5(6):949-956.

45- Tiwari R.K., Trivedi M., Guang Z.C., Guo G.Q., and Zheng G.C. 2007. Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. Plant Cell Reports 26:199-210.

46- Wise A., Liu Z., and Binns A.N. 2006. Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains methods in molecular biology, *Agrobacterium* Protocols 343: 3-13.

47- Zehra M., Banerjee S., Sharma S., and Kumar S. 1999. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on biomass and alkaloid productivity in hairy root lines of *Hyoscyamus muticus* and *H. albus*. Planta Medica 64: 60–63.

Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.2, Summer 2020, P. 273-284
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۲۸۴-۲۷۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Influence of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Roots Induction and Secondary Metabolites Production in *Ocimum basilicum* L.

M. Zare Hasan Abadi[1]- A. Ganjeali[2*]- M. Lahouti[3]- N. Moshtaghi[4]
Received: 31-07-2019
Accepted: 06-05-2020

Introduction: *Agrobacterium rhizogenes* hairy roots induction is used for secondary metabolite production in plants. *A. rhizogenes* is a genus of gram-negative soil bacteria belonging to the Rhizobiaceae family that causes hairy roots at the site of infection. Hairy roots have various advantages, including high growth rate, more genetic stability than the callus and suspension cultures, growing well on hormone-free media that have been reported effective for producing high levels of secondary metabolites. Basil (*Ocimum basilicum*) is a popular herb with important economical applications in food, cosmetic, and pharmaceutical industry. It is a digestive stimulant with anticarcinogenic, antibacterial, and anticonvulsant properties. The main phenolics reported in basil plants are in the classes of phenolic acids and flavonoids, some of which have human health benefits. This study was designed to develop hairy root culture from *O. basilicum* using different of *A. rhizogenes* strains for the production of total phenols and introduce the best strain of *A. rhizogenes* to induce hairy root and growth and production of total phenol.

Materials and Methods: Different *A. rhizogenes* strains (ATCC-15834, A4, MSU, and R1000) were studied to investigate their effects for the transformation and production of secondary metabolites in *O. basilicum*. Therefore, shoot and leaf explants and nodes of the seedlings were used for *Agrobacterium*-mediated transformation. These explants were inoculated with four *A. rhizogenes* strains and transferred to ½ MS medium. About four weeks after cultivation with *A. rhizogenes*, hairy roots were excised from the seedlings and subcultured to fresh medium MS liquid culture containing 500 mg/l cefotaxime. After 60 days of inoculation, various parameters, including dry weight, infection percentage, number of hairy roots per explant, and total phenol contents were measured. The growth rate and phenolic contents of the transformed hairy roots were compared with normal ones. Total genomic DNA was isolated from non-transgenic and transgenic hairy root lines using the Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) method. Isolated genomic DNA was used to detect the *rol*C gene through polymerase chain reaction (PCR) analysis. The PCR using specific primers for *rolC* of T-DNA and virD2 was used to confirm the nature of resulted transgenic hairy roots.

Results and Discussion: Selecting efficient *A. rhizogenes* strains, as well as the type of explants, are crucial factors for hairy root induction. All used *A. rhizogenes* strains were able to produce hairy roots. Hairy roots appeared on the nodes at the point of injection, but were not forming on the shoot and leaf explants. So, the choice of the plant material is crucial for successful transformation with *A. rhizogenes* and usually, transformation of young tissues gives the best results. The transgenic status of the hairy roots was confirmed using PCR with *rol*C and *vir*D specific forward and reverse primers. All lines showed the presence of 612 bp *rol*C amplified products, indicating the integration of T-DNA of *A. rhizogenes* and *O. basilicum*. Hairy roots could synthesize phenolic compounds, which was significantly higher in hairy roots than non-transformed control. Four hairy root lines were independently evaluated for their content and these lines showed variation in total phenolic contents, with the highest amount (312 mgGAE/ g DW) in hairy roots induced by ATCC-15834 strain and the lowest amount (113.2 mgGAE/ g DW) in hairy roots induced by R1000 strain. The results showed that the strain ATCC-15834 caused the highest infection percentage (68.1%) along with the highest number of hairy roots (4.8) per explant and root length (1.8 cm). The growth rate and phenolics production were investigated in each hairy root of *O. basilicum* from infection by four different A. *rhizogenes* strains. The highest growth rate (103.2 mg DW) and production of total phenol (312 mg/g DW) were found in ATCC-15834. The growth rate of transformed hairy roots was more than that of normal ones.Total phenol contents in all hairy roots were also increased significantly compared with non-transformed control plants (4.6 times in hairy roots induced by *A. rhizogenes* strain ATCC-15834). ATCC-15834 has been reported as the most widely used *A. rhizogenes* strain owing to its strong induction ability, and the variation in hairy root induction could be due to disparity in

1, 2 and 3- Ph.D. Student at Plant Physiology, Associate Professor and Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: ganjeali@um.ac.ir)
4- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad

the virulence of different *A. rhizogenes* strains.

Conclusion: The hairy roots of *O. basilicum* had shown promising results in terms of significant yield of phenolic contents and had the potential for being scaled-up further for phenol production. It could be concluded that *A. rhizogenes* strains had different abilities in hairy roots induction. Therefore, the selection of an effective *A. rhizogenes* strain for the production of transformed root cultures is important, highly dependent on the plant species, and must be determined in future experiments.

Keywords: Agrobacterium rhizogenes, Hairy root, Ocimum basilicum, Total phenol